



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA



CARLA ADRIANE ROYER

**FILOGENIA DE *PHYMATIDIUM* LINDLEY (ORCHIDACEAE: ONCIDIINAE)
E MONOGRAFIA DO GÊNERO PARA O ESTADO DO PARANÁ**

Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFPR como requisito para seleção de ingresso ao mestrado em Botânica na UFPR.

Orientador: Prof. Dr. Eric de Camargo Smidt.

Co-Orientador: Dr. Antonio Luis Vieira Toscano de Brito.

CURITIBA – PR

2011

RESUMO

(FILOGENIA DE *PHYMATIDIUM* LINDLEY (ORCHIDACEAE: ONCIDIINAE) E MONOGRAFIA DO GÊNERO PARA A FLORA DO PARANÁ). Orchidaceae é uma das maiores famílias dentre as Fanerógamas e está distribuída em quase todo o mundo. Devido a problemas de amostragem de táxons e regiões de DNA, muito ainda resta a ser feito para conseguir elucidar as relações filogenéticas dentro da família, e propor sistemas de classificação que reflitam sua filogenia. O gênero *Phymatidium* pertence ao grupo Ornithocephalus da subtribo Oncidiinae e consiste de dez espécies restritas principalmente ao Sudeste do Brasil. Após a publicação de revisão taxonômica que esclarece as espécies, torna-se possível a elaboração de uma filogenia através de dados morfológicos qualitativos e quantitativos, assim como, coletas recentes permitem o estabelecimento de Bancos de DNA total de plantas possibilitando a elaboração de uma filogenia molecular. Os estudos serão realizados através de consulta as coleções dos principais herbários nacionais e do Estado do Paraná e coletas em todos os tipos vegetacionais paranaenses, priorizando as regiões de Mata Atlântica, onde a maioria das espécies é referida. O seqüenciamento será feito através de serviços prestados pela empresa Macrogen especializadas em sequenciamento de amostras de DNA amplificadas. Todas as seqüências da coleção de DNA total obtidas neste projeto serão submetidas ao *Genbank*. Para avaliar se as amostras de diferentes indivíduos formam um agrupamento específico monofilético e a relação entre as espécies do gênero, serão utilizadas abordagens filogenéticas padrão de Máxima Parcimônia e Análises Baiesianas.

Palavras-Chave: Asparagales, Mata Atlântica, Monocotiledôneas.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Orchidaceae é uma das maiores famílias dentre as Fanerógamas e está distribuída em quase todo o mundo, com exceção das regiões polares e desérticas. Apresenta-se em maior amostragem e diversidade nas regiões tropicais e subtropicais, sendo a Floresta Atlântica brasileira a segunda área mais rica em orquídeas ficando apenas atrás da região andina. A família possui cerca de 25.000 espécies (DRESSLER, 1993). No Brasil esse número aproxima-se de 2.400 espécies (BARROS *et al*, 2010).

Devido à complexidade e diversidade morfológica dentro da família, existe um número grande e bastante contrastante de sistemas de classificação (entre os principais SCHLECHTER, 1926; BRIEGER, MAATSCH e SENGHAS, 1970-1984; DRESSLER, 1981; DRESSLER, 1993; SZLACHETKO, 1995). Nas últimas décadas, estes sistemas começaram a ser avaliados tanto através de estudos morfológicos (BURNS-BALOGH e FUNK, 1986; FREUDENSTEIN e RASMUSSEN, 1999) quanto moleculares (CHASE *et al*, 1994; NEYLAND e URBATSCH, 1996; CAMERON *et al*, 1999; CAMERON e CHASE, 2000; FREUDENSTEIN e CHASE, 2001). Entretanto, devido a problemas de amostragem de táxons e regiões de DNA, muito ainda resta a ser feito para conseguir elucidar as relações filogenéticas dentro da família, e propor sistemas de classificação que reflitam sua filogenia. De forma similar, embora exista um número crescente de trabalhos com filogenia dentro das subtribos (CAMERON e CHASE, 1999; VAN DEN BERG *et al*, 2000; WHITTEN, WILLIAMS e CHASE, 2000; PRIDGEON, SOLANO e CHASE, 2001; WILLIAMS *et al*, 2001; KORES *et al*, 2002) e dentro de gêneros (RYAN *et al*, 2000; VAN DEN BERG *et al*, 2000; GRAVENDEEL *et al*, 2001; WILLIAMS *et al*, 2001; CARLSWARD, WHITTEN e WILLIAMS, 2003), ainda há a necessidade de muitos estudos para elucidar as relações numa família tão diversa.

Os primeiros caracteres utilizados para inferências filogenéticas, ou seja, para

reconstrução de histórias evolutivas, foram os morfológicos. Os caracteres morfológicos foram extremamente úteis para o reconhecimento de grandes grupos, bem como para a descrição de famílias, gêneros e espécies, constituindo a base das primeiras classificações dos seres vivos. Com o advento da biologia molecular, inúmeras técnicas de acesso ao material genético foram desenvolvidas, entre as quais os ensaios imunológicos, a eletroforese de enzimas e proteínas, a hibridização do DNA e a reação em cadeia da DNA polimerase (PCR). Mais recentemente, o seqüenciamento de regiões específicas de DNA tem constituído uma nova alternativa de acesso à informação genética, permitindo comparações entre indivíduos representando diferentes níveis taxonômicos (SCHNADELBACH & VAN DEN BERG, 2011).

O termo *filogenia molecular* refere-se às relações de ancestralidade inferidas a partir de estudos moleculares. Os caracteres moleculares são extremamente úteis para inferências filogenéticas, constituindo um conjunto quase ilimitado de dados sobre o material genético. Desde então, os caracteres moleculares juntamente com os caracteres morfológicos, têm subsidiado os sistematas no aprimoramento das classificações dos seres vivos (SCHNADELBACH & VAN DEN BERG, 2011).

A primeira grande filogenia de angiospermas baseada em seqüências de DNA constituiu um marco para a sistemática filogenética. Seqüências do gene cloroplasmático *rbcL* de diferentes táxons foram comparadas e a delimitação taxonômica de alguns grupos foi modificada. Desde então, vários estudos têm buscado ampliar e aprofundar o conhecimento sobre as relações filogenéticas em angiospermas em diferentes níveis, aprimorando significativamente a taxonomia de vários grupos (SCHNADELBACH & VAN DEN BERG, 2011).

O gênero *Phymatidium* pertence ao grupo *Ornithocephalus* da subtribo *Oncidiinae* (Orchidaceae), e foi estabelecido por Lindley em 1833 baseado em *P. delicatum* e *P.*

falcifolium (TOSCANO DE BRITO, 2007). As espécies de *Phymatidium* foram primeiramente ilustradas pelo botânico brasileiro João Barbosa Rodrigues (1842 – 1909), diretor do Jardim botânico do Rio de Janeiro, na sua *Iconographie des Orchidées du Brésil* publicado postumamente por SPRUNGER *et al.* (1996). O gênero é representado por micro-orquídeas que foram pouco estudadas ao longo dos anos. São espécies raras e em risco de extinção pela sua beleza peculiar.

COGNIAUX (1905) revisou o gênero *Phymatidium* em seu tratado de Orchidaceae para a Flora Brasiliensis de Martius. As cinco espécies reconhecidas foram separadas em dois grupos segundo a presença ou ausência de uma haste distinta, a disposição das folhas, forma e consistência das folhas, e o número de vasos das folhas. Com exceção da forma das folhas e a consistência, os outros caracteres utilizados por ele não eram confiáveis para a taxonomia dos *Phymatidium* segundo Toscano de Brito (2007). Cogniaux também forneceu ilustrações de todas as espécies exceto *P. falcifolium*. Estas ilustrações foram feitas a partir de gravuras baseadas em desenhos originais de Barbosa Rodrigues (TOSCANO DE BRITO, 2007).

PABST & DUNGS (1977) forneceram uma lista com sinônimos e dados sobre a distribuição de dez espécies do gênero reconhecidas por eles. Mais recentemente, TOSCANO DE BRITO (2001) realizou uma revisão sistemática de todos os 12 gêneros do grupo *Ornithocephalus* (subtribo *Oncidiinae*) em que, a morfologia de sementes, fitoquímica, anatomia, morfologia, polinização, taxonomia e nomenclatura deste gênero foram revistos.

Segundo Toscano de Brito (2007), atualmente, *Phymatidium* consiste de dez espécies restritas principalmente ao Sudeste do Brasil e uma espécie com registros partir do Uruguai e outra da Argentina. Caracterizam-se por crescerem como epífitas em árvores e arbustos nas florestas e são freqüentes em áreas perturbadas e cultivadas.

Com a publicação da revisão taxonômica por TOSCANO DE BRITO (2007), esclarecendo as espécies torna-se possível propor uma hipótese filogenética molecular acrescentando dados morfológicos qualitativos e quantitativos, assim como o estabelecimento de Bancos de DNA total de plantas e realizar a monografia do gênero para o estado do Paraná.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MONOGRAFIA DO GÊNERO PARA O ESTADO DO PARANÁ

O estado do Paraná (área de estudo deste trabalho), situado na região sul do Brasil, está localizado entre as latitudes 22°42'30" e 26°42'59", com cerca de 470km de extensão, e entre as longitudes 48°02'24" e 54°37'38" a oeste de Greenwich, com mais de 670km de extensão. Ocupa uma área de cerca de 200.000 km², limitando-se ao norte com o estado de São Paulo, a leste com o Oceano Atlântico, ao sul com o estado de Santa Catarina e a oeste com o estado do Mato Grosso do Sul e com os países Paraguai e Argentina (MAACK, 1968).

Ocorrem cinco principais tipos de vegetação no Paraná, segundo Velloso et.al. (1991), Floresta Ombrófila Densa, no litoral e na serra do mar; Floresta Ombrófila Mista, nas regiões mais altas ao sul da região planaltina; Estepe Ombrófila, nas mesmas regiões; Floresta Estacional Semidecidual Subxérica, no norte e oeste do segundo e terceiro planaltos; e Savana Estacional Subxérica, no nordeste do estado.

Serão consultadas as coleções dos principais herbários nacionais e do estado do Paraná (FUEL, HUCP, HUEM, HUPG, MBM, UNOP, UPCB), com a finalidade de obtenção de dados sobre as mesmas e confecção de banco de dados sobre as espécies encontradas no estado e herborizadas em cada um deles.

As coletas serão realizadas em todas as áreas dos diferentes tipos vegetacionais paranaenses, priorizando as regiões de Mata Atlântica, onde a maioria das espécies é referida. As espécies encontradas serão fotografadas em campo e coletadas amostras para cultivo em casa de vegetação. Serão realizadas anotações de campo e amostras serão coletadas, prensadas e secas em estufas apropriadas e herborizadas segundo (MORI *et al*, 1989). O material será etiquetado, tombado e incorporado às coleções dos herbários UPCB e MBM.

Nas coletas, serão observados e anotados dados biológicos como: períodos de floração, habitats preferenciais e características ambientais das áreas de ocorrência, os quais servirão de base para complementar a caracterização das espécies em estudo e para construção de mapas de distribuição geográfica das mesmas.

Para a construção de mapas de distribuição geográfica das espécies será usado o programa DIVA-GIS (HIJMANS *et al.*, 2011) baseado em registros de coletas descritos na revisão de Toscano de Brito (2007) e os dados de latitude e longitude de acordo com o IBGE.

Cada espécie estudada será representada através de desenho em pranchas, feitos ao microscópio estereoscópico, com auxílio de câmara clara, contendo todos os detalhes morfológicos e diferentes fenofases das mesmas.

As identificações serão baseadas na comparação morfológica de exemplares depositados em herbário acrescidos de dados obtidos através de uma ampla revisão de exemplares herborizados e de bibliografia adequada, como DRESSLER, R.L 1993, HOEHNE, F.C 1949, PABST & DUNGS, 1975, 1977, e obra principais de cada uma das espécies encontradas no estado do Paraná, entre outros que iremos pesquisar no decorrer do desenvolvimento do trabalho.

3.2 ESTUDOS FILOGENÉTICOS

As amostras de tecidos vegetais serão armazenadas em sílica-gel, e o armazenamento de DNA total extraído e/ou purificado será armazenado em ultrafreezers (-80°C). Para a extração de amostras de DNA será utilizada a metodologia baseada no protocolo de CTAB 2X de DOYLE & DOYLE (1987), com algumas modificações, incluindo a maceração manual das amostras em cadinhos com nitrogênio líquido. As alíquotas do material serão mantidas no Banco de DNA Total de Plantas da UFPR (UPCB-DNA),

vinculadas à *vouchers* identificados no herbário UPCB e as duplicatas destes materiais enviadas para o herbário MBM.

Será amplificada e sequenciada a combinação dos fragmentos das regiões *matK*, do genoma plastidial, e o espaçador ITS (Internal Transcriber Spacer) do genoma nuclear. As amplificações de PCR serão realizadas em reações de 30µl constituídas de tampão1X, 2,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,5mM de cada *primer*, 10ng de BSA, 2,0 unidades de Taq DNA polimerase e 20-50ng de DNA genômico. As amplificações serão feitas seguindo o programa de 1 minuto de aquecimento à 94 °C e 40 ciclos de 30 segundos de desnaturação à 94 °C, 40 segundos de anelamento à 49-55 °C e 40 segundos de extensão à 72 °C, seguido de uma extensão final à 72 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR serão verificados em eletroforese horizontal em gel de agarose 1% e posteriormente corados em banho com brometo de etídio. Os produtos de PCR com boa amplificação (i.e. de 70-100ng) serão purificados com PEG 20% (DOYLE & DOYLE modificado, 1987).

O seqüenciamento será feito através de serviços prestados por empresas de biotecnologia MACROGEN localizadas na Coréia do Sul especializadas em seqüenciamento de amostras de DNA amplificadas. Todas as seqüências da coleção de DNA total obtidas neste projeto serão submetidas ao *Genbank*.

Para a realização da filogenia morfológica serão obtidos caracteres neomórficos e transformacionais baseados na observação da diversidade morfológica encontrada nos órgãos vegetativos (rizoma, pseudobulbo e folha) e reprodutivos (inflorescência, flores, sépalas, pétalas, labelo e coluna). Os caracteres levantados serão analisados quanto ao seu estado, de acordo com os quatros componentes proposto por Sereno (2007). Os componentes são: localizador (L1) (estrutura morfológica), variável (V) (aspecto que varia), qualidade da variável (q) (modificação da variável) e o estado do caracter (Vn) (condições exclusivas do caráter) (tabela 1). A partir desses quatros componentes podem-se definir

dois padrões fundamentais de caracter: o neomorfo (presença e ausência de um caracter) e o transformacional (qualidade do caracter) (SERENO, 2007).

Tabela 1: Estrutura lógica para os caracteres morfológicos. Dois tipos fundamentais são reconhecidos:

Tipo de caracter	Exemplo	Notação simbólica
Neomórfico	L ₁ V v ₀ v ₁ Folha, bainha: ausente (0); presente (1)	L ₁ ; V; v ₀ , v ₁
	L ₁ v ₀ v ₁ Inflorescência: ausente (0); presente(1)	L ₁ ; v ₀ , v ₁
Transformacional	L ₁ V q v ₀ v ₁ v ₂ Inflorescência, corte transversal, forma: Angular(0); Dobrada(1);Obliqua(2)	L ₁ ; V _q ; v ₀ , v ₁

Legenda: L_n- estrutura morfológica; V- variável; q- qualidade da variável; v_n- estado do caracter.

A terminologia empregada na descrição dos caracteres e seus respectivos estados foram extraídos de HARRIS & HARRIS (1999) e STEARN (2004).

Para avaliar se as amostras de diferentes indivíduos formam um agrupamento específico monofilético e a relação entre as espécies do gênero, serão utilizadas abordagens filogenéticas padrão: Máxima Parcimônia (MP) através do programa PAUP4b10 (SWOFFORD, 2002). Análises Bayesianas (BI) serão realizadas como o programa MrBayes Versão 3.1.2 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003). As árvores serão visualizadas e editadas através do programa Treeview (PAGE, 1996).

4 PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA

[illegible]

5. VIABILIDADE DO PROJETO

Os custos do projeto serão obtidos na parte de monografia do gênero através do projeto “Flora do Paraná”, onde são previstos auxílios para os custos de herborização e empréstimos entre herbários. As viagens a campo ocorrerão por conta do candidato e através da participação de disciplinas que envolvem campo como a “Formações Vegetacionais” oferecidas anualmente pelo Programa de Pós-graduação em Botânica da UFPR. Quanto à parte relacionada ao laboratório de Filogenia e genética da conservação de plantas, este conta com todo o equipamento e reagentes necessários à condução do projeto, assim como toda a parte computacional necessária a elaboração da filogenia morfológica. Será solicitado a Fundações de Fomento à Pesquisa, apoio financeiro ao projeto, que cubram despesas com as viagens de campo e ilustrações botânicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, F. Notas taxonômicas para as espécies brasileiras dos gêneros *Epidendrum*, *Platystele*, *Pleurothallis* e *Scaphyglottis* (Orchidaceae). **Acta Botanica Brasilica** **10**: p.139-151, 1996.

BARROS, F. *et al.* Orchidaceae. In: J.R. Stehmann, R.C. Forzza, A. Salino, M. Sobral, D.P. Costa & L.H.Y. Kamino. Plantas da Floresta Atlântica. **Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, pp. 372-403, 2010.

BRIEGER, F. G., MAATSCH R., SENGHAS K. Die Orchideen. **Paul Parey**, Berlin. 1970-1984

BURNS-BALOGH, P.; FUNK, V. A. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae. **Smithsonian Contributions to Botany** **61**: 1-79. 1986

CAMERON, K. M.; *et al.* A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from rbcL nucleotide sequences. **American Journal of Botany** **86**: 208-224. 1999

CAMERON, K. M. e CHASE, M. W. 1999. Phylogenetic relationships of Pogoniinae (Vanilloideae, Orchidaceae): an herbaceous example of the eastern North America – eastern Asia phytogeographic disjunction. **Journal of Plant Research** **112**: 317-329. 1999.

CAMERON, K. M. e CHASE, M. W. Nuclear 18S rDNA sequences of Orchidaceae confirm the subfamilial status and circumscription of Vanilloideae. Páginas 457-464 in Wilson, K. L., e D. A. Morrison, **Monocots: systematics and evolution**. CSIRO Publishing, Melbourne. 2000.

CARLSWARD, B. S., WHITTEN, W. M. WILLIAMS, N. H. Molecular phylogenetics of Neotropical leafless Angraecinae (Orchidaceae) reevaluation of generic concepts. **International Journal of Plant Sciences** **164**: 43-51. 2003.

CHASE, M. W.; *et al.* Molecular systematics of the Orchidaceae and other lilioid monocots. Páginas 61-73 in Pridgeon, A. M. **Proceedings of the 14th World Orchid Conference**. HMSO, Glasgow. 1994

COGNIAUX, A. Orchidaceae. In: C. F. P. Martius, A. G. Eichler & I. Urban, **Flora Brasiliensis**, Munich & Leipzig, Vol. 3, Part 6, 1904–1906.

DOYLE, J.; J. DOYLE. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 810–815, 1987.

DRESSLER, R. L. Phylogeny and classification of the orchid family. **Dioscorides Press**, Portland, 1993.

DRESSLER, R. L. The orchids: natural history and classification. **Harvard University Press**, Cambridge, Massachusetts, USA, 1981

FREUDENSTEIN, J. V., RASMUSSEN, F. N. What does morphology tell us about orchid relationships? - a cladistic analysis. **American Journal of Botany** **86**: 225-248, 1999.

FREUDENSTEIN, J. V., CHASE, M. W. Analysis of mitochondrial nad1b-c intron sequences in Orchidaceae: utility of length-change characters. **Systematic Botany** **26**: 643-657, 2001.

GRAVENDEEL, B.; *et al.* Molecular phylogeny of Coelogyne (Epidendroideae; Orchidaceae) based on plastid RFLPS, matK, and nuclear ribosomal ITS sequences: evidence for polyphyly. **American Journal of Botany** **88**: 1915-1927, 2001.

HARRIS, J.G.; HARRIS, M.W. Plant identification terminology: an illustrated glossary. **Spring Lake Publishing**, Utah, 198p, 1999.

HJUMANS, R. J.; GUARINO, L.; JARVIS A.; O'BRIEN R. MATHUR, P. **DIVA-GIS Version 5.4**. Disponível em: <<http://www.diva-gis.org>>. Acesso em 15 de maio de 2011.

HOEHNE, F. C. **Iconografia das Orchidaceas do Brasil**. Secretaria da Agricultura, São Paulo, 1949.

KORES, P. J.; *et al.* A phylogenetic analysis of Diurideae (Orchidaceae) based on plastid DNA sequence data. **American Journal of Botany** **88**: 1903-1914, 2002.

MAACK, R. **Geografia física do Paraná**. Curitiba: Max Roesner, 1968.

MORI, S.A. *et al.* **Manual de Manejo do Herbário Fanerogâmico**. CEPAAC - Ministério da Agricultura, Ilhéus, 2º ed., 104 p., 1989.

NEYLAND, R., URBATSCH L. E. Phylogeny of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae)

inferred from *ndhF* chloroplast gene sequences. **American Journal of Botany** **83**: 1195-1206, 1996.

PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasilienses**, Brucke-Verlag Kurt Schmiersow, Hildesheim, Vol. 2., 1977.

PAGE R.D.M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computational and Applied Biosciences** **12**, 357–358, 1996.

PRIDGEON, A. M., SOLANO, R., CHASE, M. W. Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. **American Journal of Botany** **88**: 2286-2308, 2001.

RONQUIST, F.; J. P. HUELSENBECK. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** **19**, p.1572-1574, 2003.

RYAN, A., *et al.* A phylogenetic assessment of *Lycaste* and *Anguloa* (Orchidaceae: Maxillarieae). **Lindleyana** **15**: 33-45, 2000.

SCHLECHTER, R. Das System der Orchidaceae. Notizblatt des Botanischen **Gartens und Museums zu Berlin-Dahlem** **9**: 563-591, 1926.

SCHNADELBACH, A. S. VAN DEN BERG, C. **Sistemática Molecular**. Disponível em <<http://www.uefs.br/ppbio/cd/portugues/capitulo21.htm>>. Acesso em 03 de abril de 2011.

SERENO, P.C. Logical basis for morphological characters in phylogenetics. **Cladistics**, **23**. Chicago, 2007.

SPRUNGER, S.; CRIBB, P. J.; TOSCANO DE BRITO, A. L. V. (eds.) João Barbosa Rodrigues — Iconographie des orchidées du Brésil, Vol. 1, The Illustrations. Friedrich Reinhardt Verlag, Basle, 1996

STERN, W.T. **Botanical Latin**. Timber press. Oregon. 546p, 2004.

SWOFFORD, D. L. **PAUP: Phylogenetic Analysis using Parsimony**. Version 4.0b. Illinois Natural Survey. Champaign, 2002.

SZLACHETKO, D. L. Systema Orchidaliu. **Fragmenta Floristica ET Geobotanica**

Suppl. 3: 1-152.4, 1995.

TOSCANO DE BRITO, A.V.L. Systematic review of the *Ornithocephalus* group (Oncidiinae:Orchidaceae) with comments on *Hofmeisterella* . **Lindleyana** 16: 157-217, 2001.

TOSCANO DE BRITO, A.V.L. A taxonomic revision of the genus *Phymatidium* (Orchidaceae: Oncidiinae). **The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens**, Kew, 2007.

WHITTEN, W. M., WILLIAMS, N. H., CHASE, M. W. Subtribal and generic relationship of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence. **American Journal of Botany** 87: 1842-1856, 2000.

WILLIAMS, N. H.; *et al.* Molecular systematics of the Oncidiinae based on evidence from four DNA sequence regions: expanded circumscriptions of *Cyrtochilum*, *Erycina*, *Otoglossum*, and *Trichocentrum* and a new genus (Orchidaceae). **Lindleyana** 16: 113-139, 2001

VELOSO, H. P.; RANGEL-FILHO, A. L. R.; LIMA, I. C. A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE, 1991.

VAN DEN BERG, C.; *et al.* A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. **Lindleyana** 15: 96-114, 2000.